

いて行った。その結果、海馬歯状回における BrdU 取り込み細胞数と Dublecortin 免疫陽性細胞数は、いずれも、対照群の雌雄と比較して EE 暴露による顕著な影響は認められなかった (図 14)。

7) 海馬における Dublecortin 免疫陽性細胞の樹状突起の形態

生後 24 時間以内の EE 暴露 (EE2000) が海馬歯状回における神経新生への影響を Dublecortin 免疫陽性細胞の樹状突起の形態への影響が認められるか否かを検討した。しかし、EE 投与群と対照群の間で樹状突起の形態に有意な差は認めなかった (図 15)。

8) 海馬歯状回における銀染色陽性細胞の分布

神経細胞死 (含、プログラム神経細胞死) のマーカーとして銀染色キットによる銀染色を行った。その結果、対照群の雌雄と比較して EE 暴露による顕著な影響は認められなかった。この傾向は海馬歯状回全域にわたって認められた (図 16)。

D. 考察

臨界期における皮下からの高濃度 EE の単回暴露は、曝露後の極めて短時間 (1 時間以内) で脳内への移行および濃度上昇が起こり、濃度は 4 時間前後にピークに到達し、半日後にはピーク時の約 30% にまで減少、24 時間後には検出限界以下になる推移をとることが明らかとなった。このことは、新生仔期の EE 皮下投与曝露による脳への EE 移動は、曝露後極めて短時間の間にピークに達し、脳自体が高濃度に曝露される時間は 12 時間以内であることを示している。

新生仔期の高濃度 EE の単回暴露は、海馬の生後神経新生ならびに脳室下帯の生後神経新生の指標とした OBFR への影響は認められなかった。

一方、新生仔期の高濃度 (2,000 μ g/kg) ならびに中濃度 (20 μ g/kg) EE 単回暴露は、POA における CB の免疫陽性細胞分布の性的二型パターンに明瞭な影響を及ぼすリスクがあることが示された。また、性成熟後の雄の性行動コミュニケーションの特徴である USV 発声にも影響を及ぼすことが明らかとなった。すなわち、出生当日におけるわずか 1 回の EE 大量曝露は、脳内の CB 分布の性的二型パターンに異常を誘発するばかりでなく、行動学的にも性的異常を誘導するリスクがあることを示している。

本研究の結果は、発育期におけるあの濃度以上の EE 暴露は、生後神経新生に及ぼすリスクは少ないと考えられるものの、それがたとえ単回であったとしても、脳内のエストロゲン感受性の高い脳領域の正常発達に悪影響を及ぼし、通常の性的コミュニケーションパターンの成立に影響を及ぼすことを示唆している。

E. 結論

新生仔期の EE 曝露は、極めて短い時間で脳内への移動と濃度上昇を起こし、脳は約 12 時間にわたって EE の曝露を受けることを明らかとしている。この短時間の脳における EE 曝露は、成熟後において、海馬などの高次脳機能を司る領域の新生細胞数には有意な影響は及ぼさない一方、性ステロイド感受性の高い脳領域 (内側視束前野) には生涯にわたる影響を及ぼし、正常な性的コミュニケーションに障害を及ぼすことを

示している。

本研究の結果は、新生仔期における EE 曝露は短時間であったとしても、その濃度が高い場合は、性行動や生殖内分泌制御に関与する領域に対して生涯にわたって影響は、性ステロイドホルモンへの感受性が高い領域を中心に及ぼされ、リスクが高いことを念頭に入れておく必要があることを示している。

F. 研究発表

Yokosuka. M., Adachi H., Nakada T., Saito TR. and Yoshida M. Neonatal exposure to 17 alfa-ethinylestradiol alters the calbindin-immunoreactive cell aggregates in the preoptic area of the mice. *Neuroscience 2012 41th Annual Meeting Society for Neuroscience*, NewOrleans, 2012 年 10 月 15 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

EE level in the brain

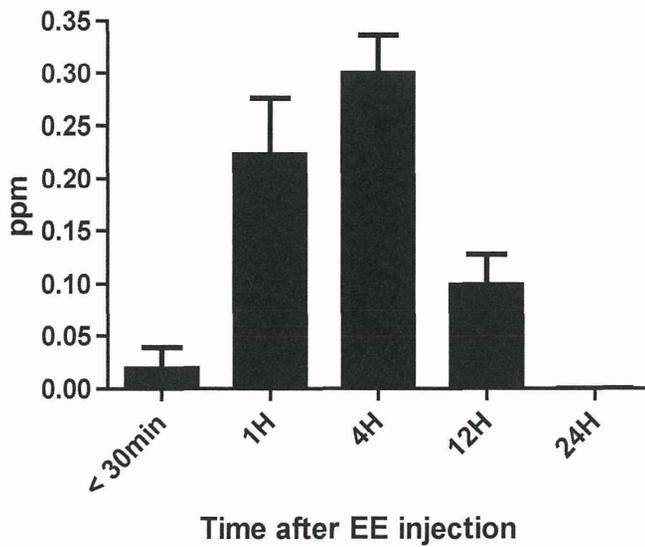


図1：新生仔マウスへのEE (2,000 μ g/kg) 皮下投与後の脳内EE濃度の推移。

生後24時間以内のマウス新生仔の皮下にEEを投与。<30min は投与後30分以内。1H、4H、12H、24Hは、投与後1時間後、4時間後、12時間後、24時間後。新生仔脳標本1g (12~14匹分) を1サンプルとして、各群3サンプルの測定結果で示す。24時間後 (24H) は3サンプルとも検出限界以下であった。

Male

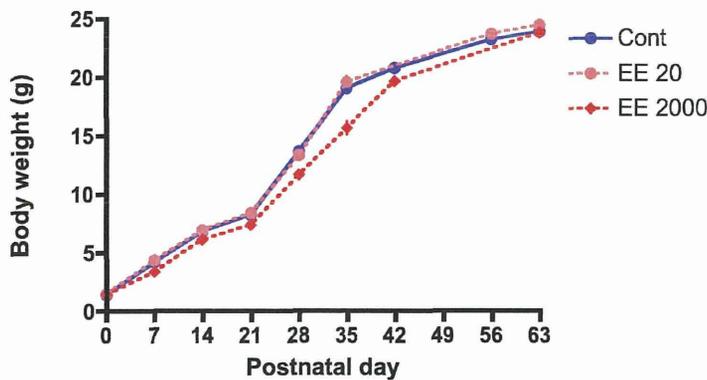
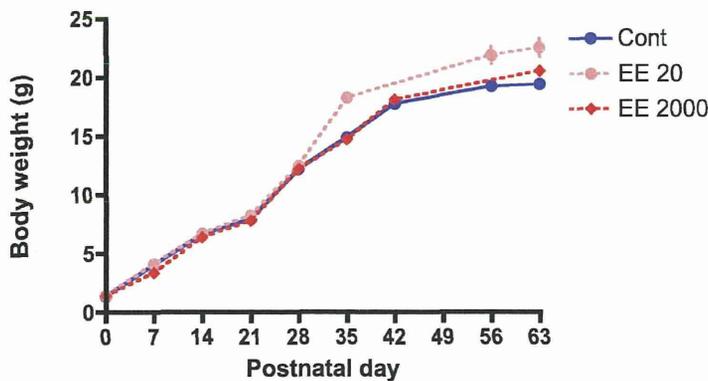


図2：新生仔マウスへのEE (20 μ g/kg, 2,000 μ g/kg) 投与が及ぼす成長への影響。

雌雄とも体重増加に対するEE投与による顕著な影響は認められなかった。しかし、雄ではEE2000群において、21日齢から42日齢の期間において一時的に他の群 (対照群およびEE20群) よりも体重が低い現象が観察された。雌では、春機発動期 (35日齢) 以降において、他の群 (対照群およびEE2000群) よりも体重が高くなる現象が観察された。

Female



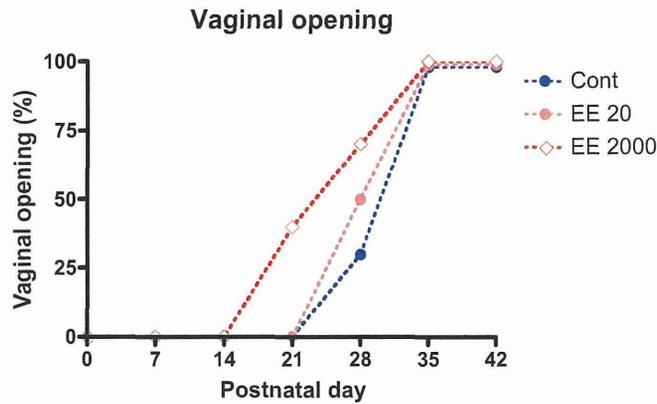


図3：新生仔マウスへのEE（20 μ g/kg, 2,000 μ g/kg）投与が及ぼす膣開口への影響。EE2,000 μ g投与群では対照群に比べて膣開口を早期に示す個体が多く認められた。また、EE20 μ gの投与群でも対照群よりも膣開口を早期に示す個体の割合が多く認められた。

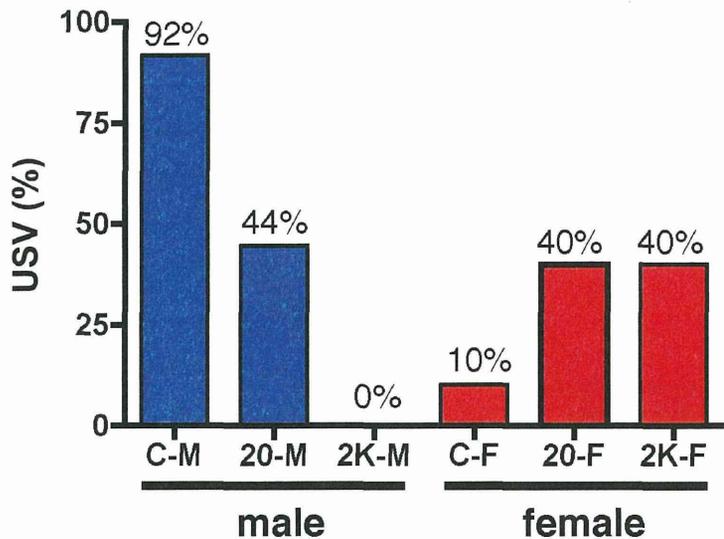


図4：成熟雌との接触におけるUSV発声への影響

超音波測定装置（Avisoft Ultrasound recorder, Model 116H, Avisoft Bioacoustics, Berlin, Germany）を用いて、発情雌導入時における接触時における発声（100～150kHzの超音波：以下、USV）を測定した。対照群雄（C-M）では92%（12例中11匹）の割合で100-150kHzのUSVが認められた。EE2000群雄では全例（6匹中0匹）でUSVが認められなかった。EE20群雄では44%（9匹中4匹）で弱いUSVが認められた。一方、雌では対照群では10%（10例中1例）であったのに対し、EE20群では40%（5例中2例）、EE2000群でも40%（10例中4例）の個体で100-150kHzのUSVが認められた。

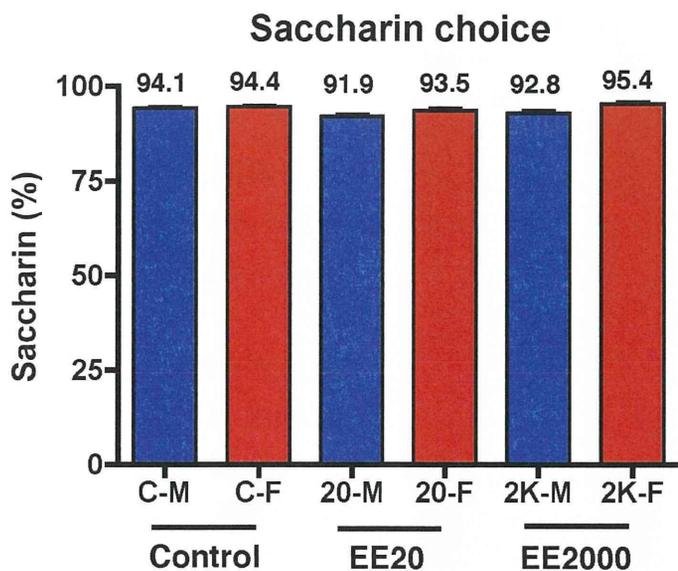


図5：甘味好選性に対する影響。

水道水と水道水に2.5% サッカリン（サッカリンナトリウム2水和物、和光純薬）を溶解した給水便を同時に提示する「2ボトル法」により、群飼育ケージ（1ケージ4ないし5匹）における甘味好選性の計測を行った。連続3日間における給水便の総重量を期間中の飲

水量として、水道水とサッカリン水の合計飲水量に対するサッカリン水重量の割合（%）での比較。飲水量測定は3日間隔で計5回行い、実験群間におけるサッカリン量の割合の平均重量で比較した。群間における有意な差は認められなかった。C-M: 対照群雄、C-F; 対照群雌、20-M: EE20 μ g/kg 投与雄、20-F: EE20 μ g/kg 投与雌、2K-M: EE2,000 μ g/kg 投与雄、2K-F: EE2,000 μ g/kg 投与雌。

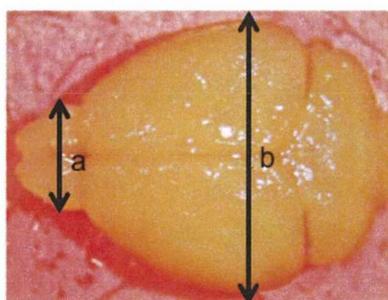
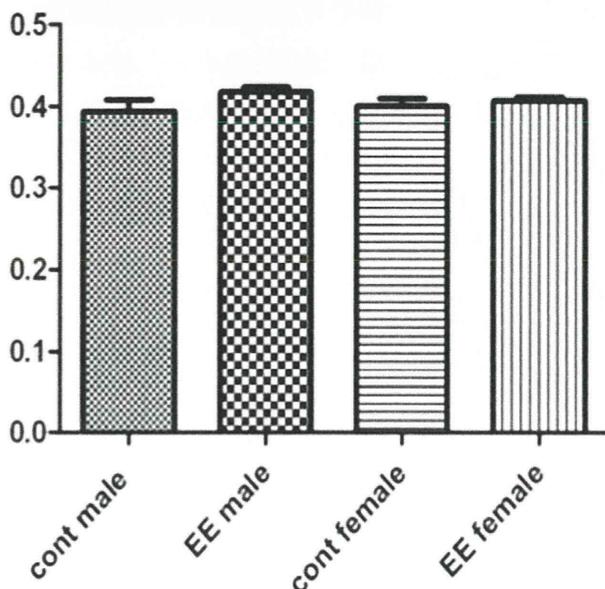


図6：大脳-嗅球比（OBBR）への影響。

生後24時間以内にEE（2,000 μ g/kg）の投与を受けた180日齢の脳における、大脳の最大幅（b）に対する嗅球の最大幅（a）の割合を算出した。EE投与により有意な変化を認められなかった。



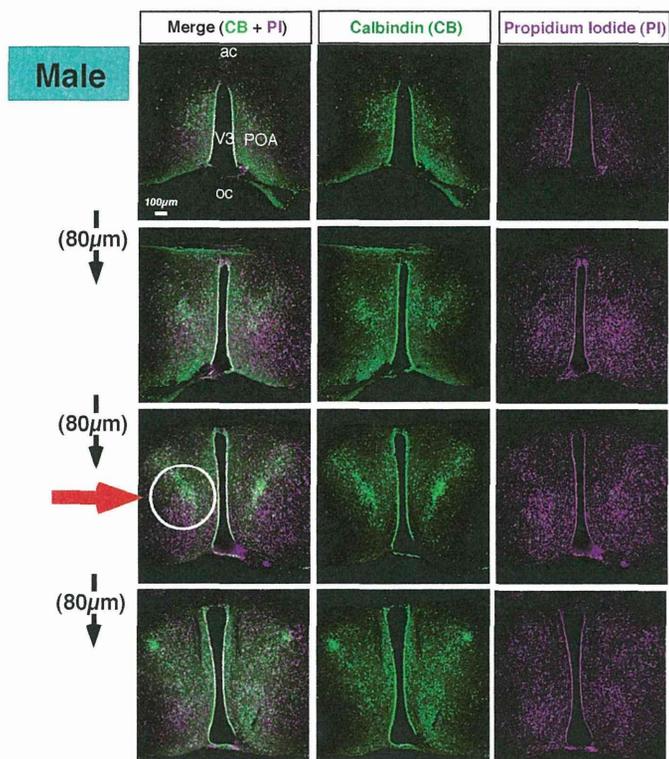


図 7: 対照群雄 (90 日齢) の内側視索前野 (POA) における、Calbindon D-28k 免疫陽性細胞の分布。

POA の中心部を含む 80µm 間隔の連続切片。雄では POA の中心領域 (赤の矢印) に CB 免疫陽性細胞の大きな塊が観察される。緑は Alexa 488 による CB 陽性反応。Propidium Iodide (PI: 紫色) 染色によって組織構造を示している。

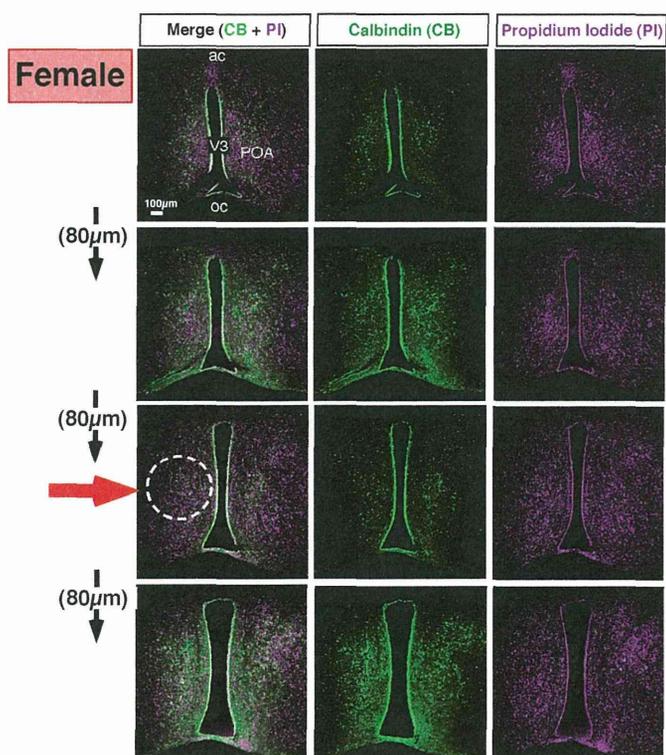


図 8: 対照群雌 (90 日齢) の内側視索前野 (POA) における、Calbindon D-28k 免疫陽性細胞の分布。

POA の中心部を含む 80µm 間隔の連続切片。雌では雄のように POA の中心領域 (赤の矢印) においても CB 免疫陽性細胞の大きな塊は観察されない。緑は Alexa 488 による CB 陽性反応。Propidium Iodide (PI: 紫色) 染色によって組織構造を示している。

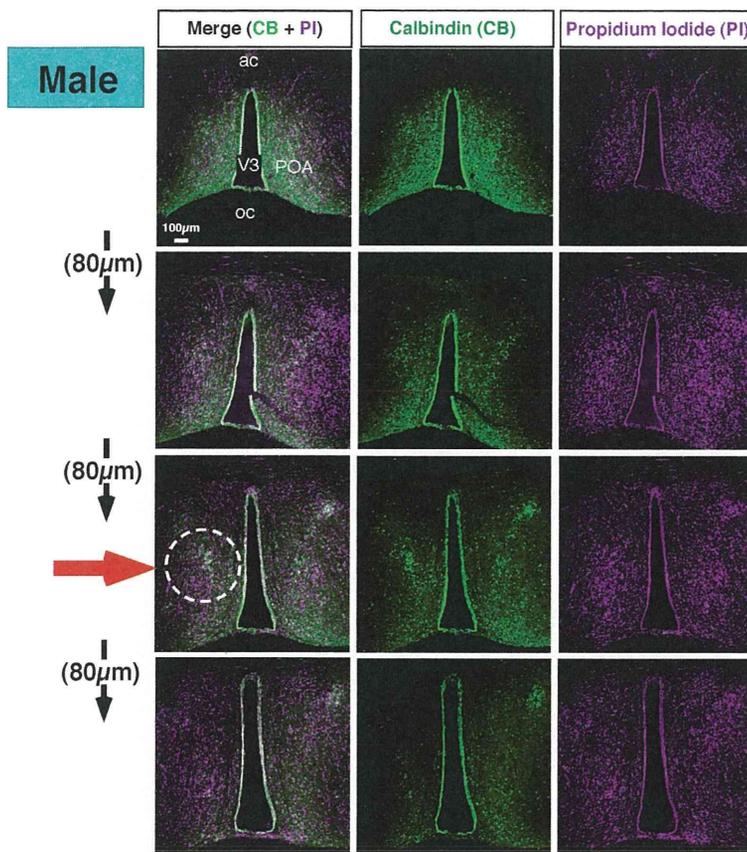


図 9 : 生後 24 時間以内に Ethynylestradiol (EE 2,000µg/kg) を単回皮下投与された 90 日齢雄の POA における CB 陽性細胞の分布。

EE 投与により、雄では明確であった CB の塊 (図 5 の赤矢印の指すところを参照) の領域が縮小している (赤矢印)。緑は Alexa 488 による CB 陽性反応。Propidium Iodide (PI : 紫色) 染色によって組織構造を示している。

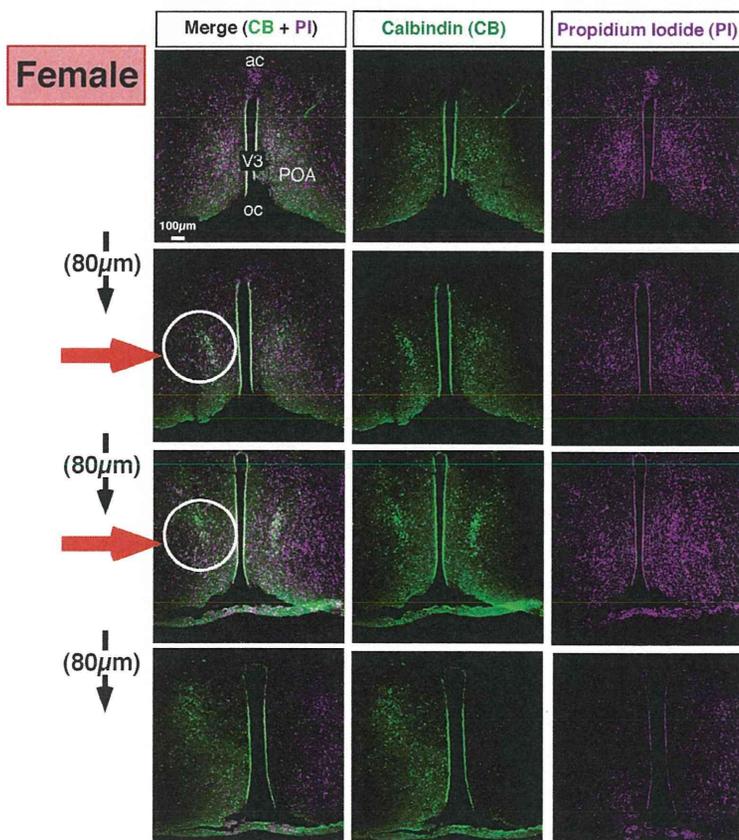


図 10 : 生後 24 時間以内に Ethynylestradiol (EE 2,000µg/kg) を単回皮下投与された 90 日齢雌の POA における CB 陽性細胞の分布。

EE 投与により、雌では不明確であった CB の塊 (図 5 の赤矢印の指すところを参照) の領域が雄のように拡大していることがわかる (赤矢印)。緑は Alexa 488 による CB 陽性反応。Propidium Iodide (PI : 紫色) 染色によって組織構造を示している。

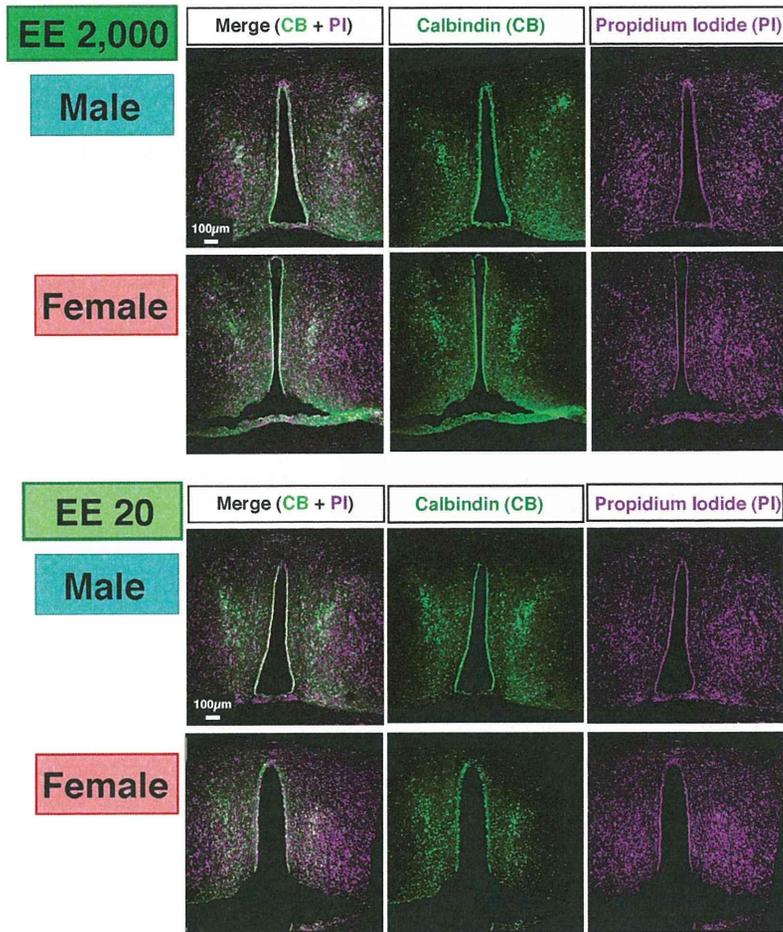


図 11 : 生後 24 時間以内に Ethynylestradiol を 2,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ あるいは 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を単回皮下投与された 90 日齢雌雄の POA 中心部における CB 陽性細胞の分布。雄における CB の減少と雌における CB の増加は、EE20 群に比べて EE2000 群の方が顕著であることがわかる示された。緑は Alexa 488 による CB 陽性反応。Propidium Iodide (PI : 紫色) 染色によって組織構造を示している。

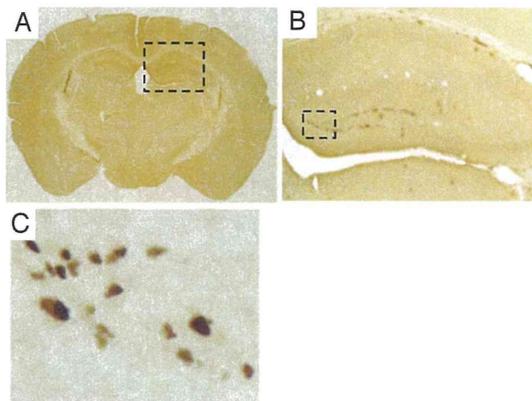


図12：生後24時間以内にEthinylestradio 1 (EE 2,000 μ g/kg) あるいは対象群 (ゴマ油) を投与した雌雄マウス (180日齢) の海馬歯状回におけるBrdU取り込み細胞。

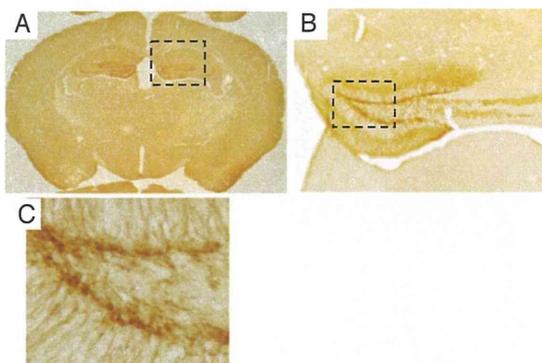
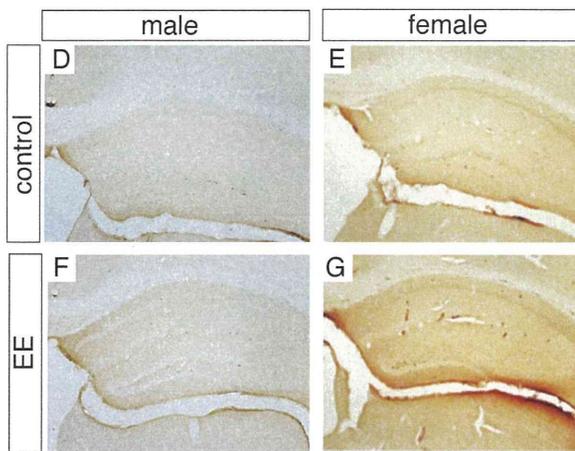


図 13：生後 24 時間以内に Ethinylestradiol (EE 2,000 μ g/kg) あるいは対象群 (ゴマ油) を投与した雌雄マウス (180 日齢) の海馬歯状回における Duplecortin 免疫陽性細胞の分布。前頭断方向で 50 μ m 厚の連続切片を作製した。一次抗体の染色は VECTASTAIN キット (Vecta 社) を用いた DAB 発色によって行った。

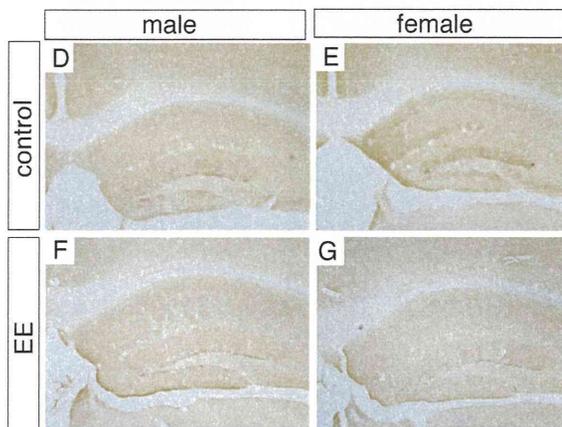
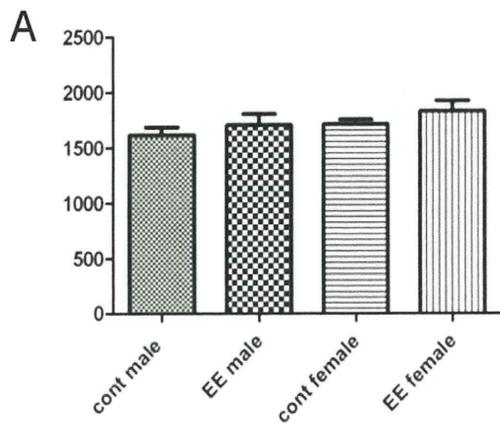


図 14：生後 24 時間以内に Ethinylestradiol (EE 2,000 μ g/kg) あるいは対象群 (ゴマ油) を投与した雌雄マウス (180 日齢) の海馬歯状回における BrdU



取り込み細胞数 (A) と Duplecortin 免疫陽性細胞数 (B)。処理群の間に有意な差は認められなかった。Cont male: 対照群の雄、Cont female: 対照群の雌、EE male: EE 投与の雄、EE female: EE 投与の雌

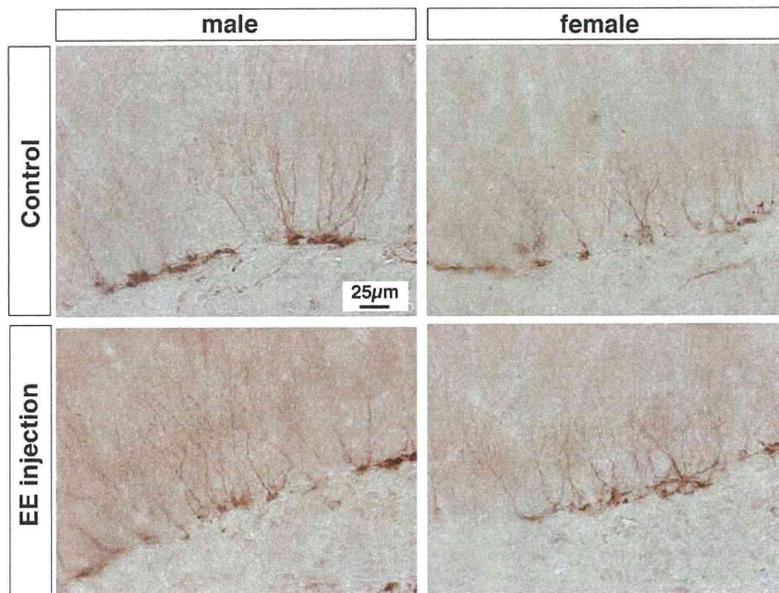
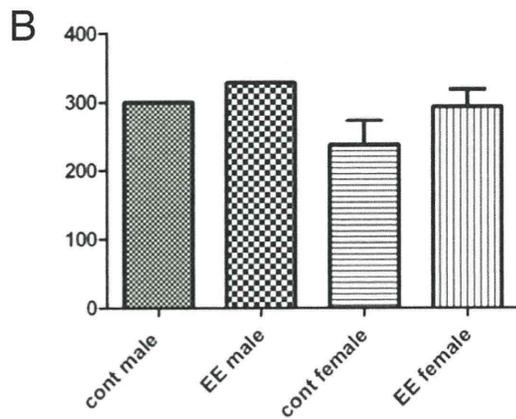


図15 : 生後24時間以内にEthinylestradio 1 (EE 2,000 μ g/kg)あるいは対象群(ゴマ油)を投与した雌雄マウス(180日齢)の海馬歯状回におけるDuplecortin免疫陽性細胞の樹状突起の比較。一次抗体の染色はVECTASTAINキット

(Vecta社)を用いたDAB発色によって行った。樹状突起の形態は群間で顕著な差は認められなかった。

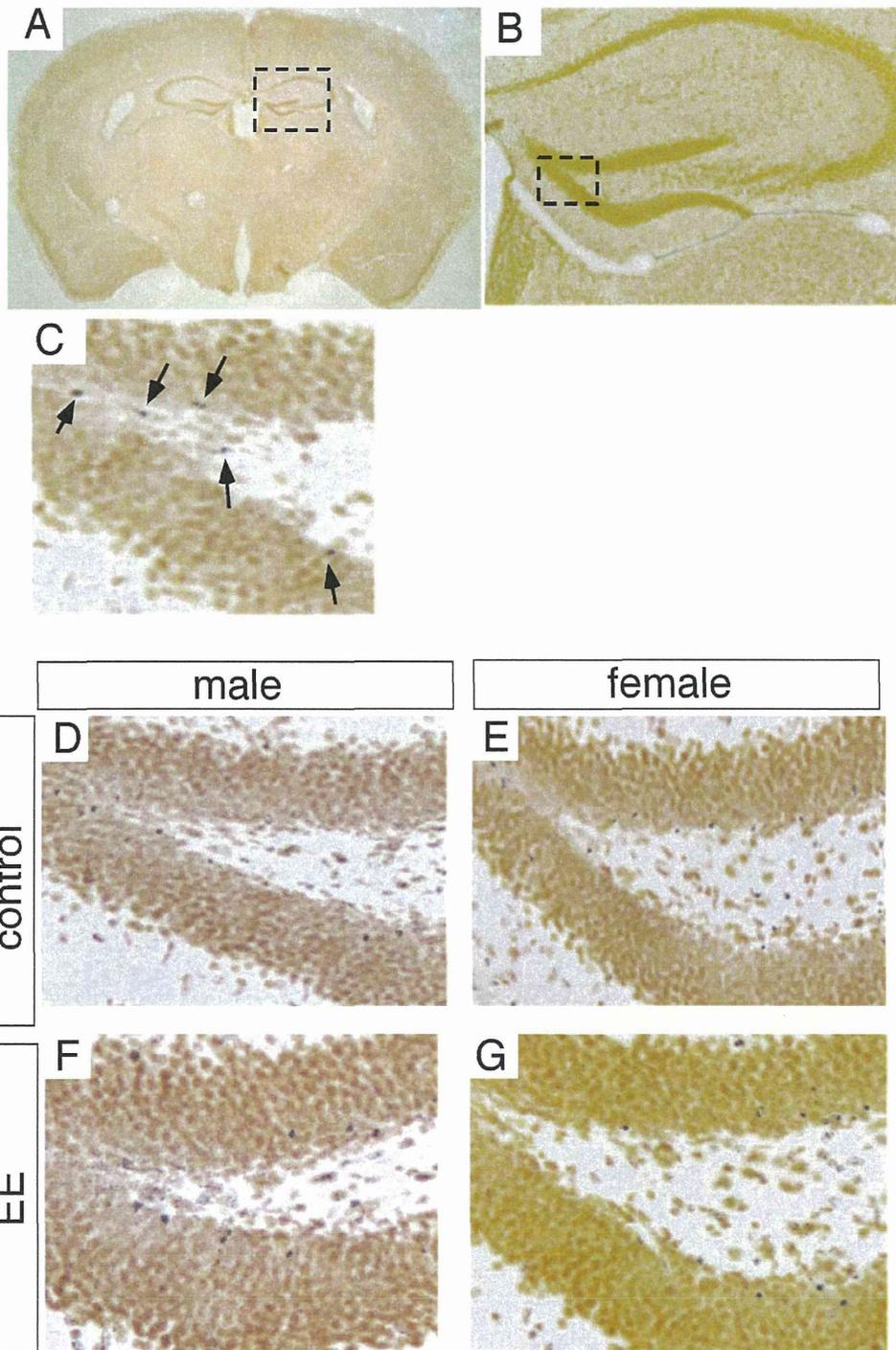


図 16 : 生後 24 時間以内に Ethynylestradiol (EE 2,000 μ g/kg) あるいは対象群 (ゴマ油) を投与した雌雄マウス (180 日齢) の海馬歯状回における銀染色陽性細胞の分布。前頭断方向で 50 μ m 厚の連続切片を作製した。染色は FD NeuroSilver Kit II (FD NeuroTechnologies 社) を用いて行った。写真 C の矢印は銀染色による陽性細胞を示す。

。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

化学物質の臨界期曝露が神経内分泌・生殖機能へ及ぼす遅発型影響の
機序解明と指標の確立に関する研究

分担研究課題： 化学物質およびホルモンの臨界期曝露による神経内分泌系への遅発型影響に対する神経行動学的アプローチ

研究分担者：	川口真以子	学校法人明治大学	農学部農学科	動物環境学研究室
研究協力者：	溝口康	学校法人明治大学	農学部農学科	動物遺伝資源学研究室
	平野顕宏	学校法人明治大学	農学部農学科	動物環境学研究室
	小峰千亜希	学校法人明治大学	農学部農学科	動物環境学研究室
	神島愛未	学校法人明治大学	農学部農学科	動物環境学研究室
	志賀健臣	学校法人明治大学	農学部農学科	動物遺伝資源学研究室

研究要旨

本研究は臨界期にエストロゲン様物質(EDs)を曝露し、行動神経内分泌学的変異を検討することで遅発型影響の機序解明と早期指標を確立することを目的とする。具体的には行動学的解析による遅発型影響とそのメカニズムの解明及び早期指標の確立を目指し、EDs のひとつである 17 α -ethynylestradiol (EE) を臨界期に曝露し、各種神経行動学的解析を行った。その結果、雌ラットへの EE 曝露は、性選好性では用量依存的に、性行動では高濃度である 2 mg/kg でのみ減弱を引き起こした。エストロゲン受容体 α 発現量解析において、部位特異的な発現変化が認められた。また、雌ラットの活動量、うつ様行動、摂食行動および体重へは本研究の曝露条件では影響を及ぼさないことを明らかとした。

A. 研究目的

エストロゲンは脳に構造的、機能的な変化を引き起こすことが知られ、その作用は形成作用と活性作用とに分けられると考えられている(図 1)。エストロゲンの形成作用は出生前後の一時期におこる不可逆的なもので、未発達で可塑性に富んだ神経組織に作用して神経細胞の形態や神経回路を固定化する(1, 2)。従って、この時期にエストロゲン様作用をもつ化学物質 (EDs) に曝露されると、正常な脳の分化が阻害される場合がある(3, 4)。一方、活性作用は神経細胞や神経回路の活動を賦活するもので、可逆的である。多くの場合、ホルモンによって形成作用が引き起こされる神経機構に対し、発達後に活性作用が認められる。エストロ

ゲンが形成作用を及ぼす神経機構は、生殖、摂食、情動、高次機能と多岐にわたり(図 2)、その多くは遅発型影響である(5, 6)。しかし発達期 EDs 曝露が引き起こす神経機構への遅発型影響の機序は一部しか解明されていない。

そこで本研究では発達期に EDs を曝露し、行動変化および神経内分泌系の変異を検討することで遅発型影響の機序解明と早期指標を確立することを目的とした。

B. 研究方法

生後 24 時間以内の Sprague-Dawley (SD) 系雌雄ラットにごま油に溶解した 17 α -ethynylestradiol (EE, Sigma Aldrich, USA) 2 μ g/kg、8 mg/kg、ごま油 (oil) を、

あるいは Wistar-Imamichi (WI) 系雌ラットに、EE 20 µg/kg、2 mg/kg、陽性対照として 17β-estradiol (E2, Sigma Aldrich, USA) 20 mg/kg、oil を各々皮下投与した。陽性対照である E2 は、繁殖行動の一部を司る視床下部の性的二型核 SDN-POA の雌における大きさを、雄と同じくらいの大きさにすることが報告されている濃度を用いた(7)。これらの動物は、一腹あたり 8 匹ずつになるよう調整し、生後 21 日齢で離乳させた後、行動神経内分泌学的解析のため、以下の実験に供した。

<性選好性試験>OVX し EB 5 µg/0.1 ml および P 500 µg/0.1 ml を投与して発情状態とした 10~14 週齢 WI 雌ラット：ステンレス製格子等で 3 部屋に区切られた黒色塩化ビニル製 3 チャンバーケージ (図 3) に予め動物を慣らし、雄あるいは発情雌への接近回数・接近時間を 5 分間測定した。相手雄ラットは同週齢の WI ラットを用い、事前に性行動を 3 回練習させた。相手雌ラットは OVX し EB 5 µg/0.1 ml および P 500 µg/0.1 ml を投与して発情状態とした。実験は 1 週間間隔で 2 回検討し、相手ラットの組み合わせは 1 回目と 2 回目を変えた。本試験終了後に引き続き性行動試験を行っているため、1 回目は性行動未経験、2 回目は性行動経験後の条件である。

<性行動試験>卵巣摘出 (OVX) し Estradiol Benzoate (EB) 5 µg/0.1 ml および Progesterone (P) 500 µg/0.1 ml を投与して発情状態とした 10~14 週齢 WI 雌ラット：予め動物を慣らした透明アクリル製装置内で、性選好性試験を行ったテスト雌ラットと相手雄ラットを 20 分間同居させ、雄の交尾行動であるマウントの回数に対する雌の受容性を示すロードシス反応の割合であるロードシス商を測定した。実験は 1 週間間隔で 2 回検討し、相手雄との組み合わせは 1 回目と 2 回目を変えた。

<エストロゲン受容体 α 発現量測定> OVX し EB 5 µg/0.1 ml および P 500 µg/0.1 ml を投与して発情状態とした 14~16 週齢 WI

雌ラット：性行動に関与していると考えられる視床下部内側基底部・内側視索前野の組織における ERα タンパク質発現量を検討した。凍結組織より Mammalian Protein Extraction Buffer (GH Healthcare) と Inhibitor Cocktail kit (Thermo Scientific) を混和した抽出 Buffer で抽出し、2-D Quant Kit (GE Healthcare) のプロトコルに従い定量を行った。40 µg/µl のタンパク質を SDS-PAGE を用いて分離した。免疫染色には一次抗体 (Anti-ERα 1:500, Santa Cruz Biotechnology)、二次抗体 (Anti-rabbit 1:1000, R&D systems) を用いて反応させた。検出には LAS-4000 IR multi color (Fujifilm) を用い、バンドの濃さからタンパク量を比較した。

<オープンフィールド試験>無処置 4~5 週齢 SD 雌雄ラットあるいは WI 雌ラット及び、OVX あるいは OVX して実験 24 時間前に EB 5 µg/0.1 ml 投与した 11 週齢 WI 雌ラット：塩化ビニル製円形オープンフィールド (直径 75 cm、高さ 41 cm、図 5) にラットを入れ、5 分間の行動を上部から撮影した後、画像解析ソフト Ethovision XT8 (Noldus) を用いて総移動距離、平均移動速度、中央滞在時間を測定した。

<高架十字試験>無処置 6 週齢 SD 雌雄ラット及び、OVX あるいは OVX して実験 24 時間前に EB 5 µg/0.1 ml 投与した 12~15 週齢 WI 雌ラット：壁のないオープンアームと壁のあるクローズドアームからなる高架十字 (図 7) の中央部にラットを入れ、5 分間の行動を上部から撮影した後、画像解析ソフト Ethovision XT8 を用いてオープンアームへの侵入回数・滞在時間を指標に探索・不安様行動について測定した。

<ガラス玉覆い隠し試験>無処置 7 週齢 SD 雌雄ラット：ガラス玉をホームケージの床敷きの上に置き、ラットが 10 分回りの間に床敷きで覆い隠したガラス玉数を不安様行動の指標として測定した (図 8)。

<強制水泳試験>無処置 9 週齢 SD 雌雄ラット：ラットを水で満たされた円柱水槽に 15 分間入れ、24 時間後に再び 5 分間水

槽に入れた時に動かなくなるまでの時間および総無動時間をうつ様行動の指標として測定した (図 9)。

＜受動回避学習試験＞無処置 4、8 週齢 SD 雌雄ラット、6 週齢 WI 雌ラット及び、OVX あるいは OVX して獲得試行の 24 時間前に EB 5 $\mu\text{g}/0.1 \text{ ml}$ 投与した 15~17 週齢 WI 雌ラット：受動回避学習試験装置 (図 10) を用い、嫌悪刺激の 24 時間後における学習成績について検討した。

＜新奇物体認知試験＞OVX した 12~13 週齢 WI 雌ラット：黒色塩化ビニル製ケージを用い、弁別法による物体に対する探索行動を指標として、学習成績について検討した。なお 1 回目の実験で、物体の選好性に化学物質曝露の影響が検出されたため、物体を変更して 2 回目を行った。

＜社会性認知試験＞OVX した 16 週齢 WI 雌ラット：ステンレス製格子等で 3 部屋に区切られた黒色塩化ビニル製 3 チャンバーケージ (図 12) に予めテストラットを慣らし、未知の相手雌ラットを 1 匹入れ探索行動をさせ社会性の強度を検討した。その後チャンバーから 2 匹を取出し、インターバルの後テストラットおよびさきほどの未知ラットを既知ラットとして、さらに別の未知雌ラットを新たな未知ラットとして入れ、既知・未知ラット各々へのテストラットの接近回数・接近時間を測定し、社会性認知を検討した。相手雌ラットは OVX した 15 週齢の WI ラットを用いた。

＜摂食量測定試験＞卵巣摘出済み 15~16 週齢 WI 雌ラット：Med 社製ペレットフィーダーを用い、18:30~翌日 16:00 の摂食量について測定した。摂食量測定装置に 5 日間馴化したのち、体重が前日から増加した日の 2 日分のデータを平均して用いた。同時に体重も測定した。

＜母子分離誘発啼鳴反応試験＞0 週齢 WI 雌ラット：生後 24 時間以内に oil あるいは E2 を曝露した動物を用い、母親および同腹仔から引き離されると発する、20 kHz~60 kHz の超音波領域に主成分を持つ啼鳴反応

を 5 分間測定した (図 14)。また、何も曝露していない動物を用い、啼鳴反応における 30 分前のジアゼパム 0.03 mg/kg 投与の影響が、性差を有するか否か検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験は武蔵野大学薬学研究所動物実験委員会委員あるいは明治大学農学部動物実験委員会委員の許可の下で行った。行動実験はラットに対し堪え難い程の苦痛を与えないレベルで行った。

C. 研究結果

＜性選好性試験＞生後 24 時間以内の EE 及び陽性対照である E2 曝露は性選好性を消失させた。また、EE 曝露による性選好性への影響は濃度依存的に表れた (表 1)。

＜性行動試験＞生後 24 時間以内の 2 mg/kg EE 曝露は陽性対照である E2 よりは弱かったが、成熟後の WI 雌ラットの性行動を抑制した (図 4)。

＜エストロゲン受容体 α 発現量＞視索前野では、実験 48 時間前 EB 投与をしなかった場合に、生後 24 時間以内の 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EE 曝露でエストロゲン受容体 α 発現量が増加した。視床下部内側基底部では、実験 48 時間前に EB 投与をした場合のみ生後 24 時間以内の 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EE 曝露でエストロゲン受容体 α 発現量が増加した。

＜オープンフィールド試験＞オープンフィールド試験においては、8 mg/kg EE 曝露 SD 雄ラットで活動量の指標である総移動距離の低下が認められた以外は、影響は認められなかった (図 6)。また、実験 24 時間前の EB 投与条件下でも生後 24 時間以内の EDs 曝露の影響は検出されなかった。

＜高架十字試験＞無処置 6 週齢 SD 雌雄ラットでは生後 24 時間以内の EE 曝露による影響は表れなかった。一方、OVX12 週齢 WI 雌ラットの oil 群において、実験 24 時間前の EB 投与により不安様行動の減弱が見られたが、曝露群では EB 投与の影響は消失した。

＜ガラス玉覆い隠し試験＞雌雄 SD ラッ

トにおけるガラス玉覆い隠し試験には生後 24 時間以内の EE 曝露の影響は表れなかった。

＜強制水泳試験＞雌雄 SD ラットにおける強制水泳試験には生後 24 時間以内の EE 曝露の影響は表れなかった (図 9)。

＜受動回避学習試験＞無処置 4 週齢 SD 雌雄ラットでは生後 24 時間以内の EE 曝露による影響は表れなかったが、8 週齢 SD 雌ラット 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EE 曝露群 (図 11) および 6 週齢 WI 雌ラット 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EE 曝露群では学習成績の低下が認められた。

＜新奇物体認知試験＞OVX した 12~13 週齢 WI 雌ラットにおいて、1 回目では生後 24 時間以内の 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EE 曝露で物体認知が低下した。しかし、物体を変更して行った 2 回目においては、その影響を検出することができなかった。

＜社会性認知試験＞未知ラットへの接近行動には群間に有意差は認められなかったが、その後の既知ラットと未知ラットの同時提示では、oil と E2 曝露においてのみ未知ラットへの接近が有意に増加した。

＜摂食量測定＞OVX15 週齢 WI 雌ラットにおける摂食量には生後 24 時間以内の EE・E2 曝露の影響は表れなかった (図 13)。体重においても影響は表れなかった。

＜母子分離誘発啼鳴反応試験＞0 週齢 WI 雌ラットにおいて、母子分離後の啼鳴反応には生後 24 時間以内の E2 曝露の影響はみられなかった。また、ジアゼパム投与は本試験において性差を示さなかった。

D. 考察

2 回試験を繰り返した結果を総合的に判断すると、性選好性試験では陽性対照の E2 曝露、2 mg/kg EE 曝露、20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EE 曝露の順に性選好性が低下したことから、生後 24 時間以内の EDs 曝露は濃度依存的に性選好性を抑制するものと考えられる。一方性行動は、主に陽性対照群で影響が表れ、2 mg/kg EE 曝露でも低下が見られることがあることが示されたが、20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EE 曝露では

影響が表れなかったことから、性選好性より EDs 曝露に対する感受性が低い可能性がある。

エストロゲン受容体 α 発現量は、今回の結果では 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EE 曝露において、視索前野では実験 48 時間前 EB 投与をしなかった場合に、視床下部内側基底部では実験 48 時間前 EB 投与をした場合に増加した。従って、エストロゲン受容体 α 発現への生後 24 時間以内の EDs 曝露の影響は脳領域により異なり、さらにエストロゲン感受性も部位特異的に変化させる可能性が示された。

オープンフィールド試験においては、生後 24 時間以内の 2、20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EE、2、8 mg/kg EE 及び 20 mg/kg E2 曝露は雌ラットの活動量に影響しないことが示された。

高架十字試験においては、20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EE 曝露において不安様行動が表れる場合があった。しかし結果は安定せず、ガラス玉覆い隠し試験でも曝露による影響は認められなかった。加えて、強制水泳試験においても影響が表れなかったことから、不安・うつ様行動に対する本試験で用いた EE・E2 曝露の影響はあるとしても軽微である可能性が高い。一方、高架十字試験で、実験 24 時間前の EB 投与により oil 群の不安様行動の減弱が見られたが、生後 24 時間以内の EDs 曝露群では EB 投与の影響は認められなかったため、情動行動のエストロゲン感受性に関してはさらに検討する必要がある。

受動回避学習試験では、無処置 6~8 週齢 2 あるいは 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EE 曝露雌ラットにおいて学習成績が低下したが、4 週齢においてはそのような影響が検出されなかったことから、春季発動後の内因性エストロゲンが学習行動へ及ぼす影響に対して生後 24 時間以内の EDs 曝露が影響し学習成績を低下させる可能性がある。

新奇物体認知試験 1 回目において、受動回避学習試験と類似の、20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EE 曝露での学習成績の低下傾向が検出されたが、2 回目では検出することができなかった。これは、物体を変更したことが結果の不一致

に影響している可能性がある。今後さらに方法を改善し、検討する必要がある。

社会性認知試験では、未知ラット単体提示における接近行動には群間に有意差は検出されなかったため、社会性行動そのものには本実験の曝露は影響していないと思われる。また、未知・既知ラット同時提示における未知ラットに対する接近が既知ラットに比べて有意に多かった oil 群と E2 曝露群では、同種の個体識別、つまり社会性認知能力があることが示された。一方、20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EE 曝露と 2 mg/kg EE 曝露では有意な影響が認められなかったことから、社会性認知能力が低下している可能性が示唆された。従って EE は E2 とは異なる独自の機序により社会性認知能力を低下させる、あるいは陽性対照より低濃度の EDs が社会性認知能力を低下させる可能性がある。

摂食行動および体重においては、生後 24 時間以内の EE・E2 曝露の影響は表れなかった。摂食行動も脳が制御する性差の見られる行動であり、それに伴い体重にも性差が表れるが、本実験の曝露条件ではこれらの指標には影響を及ぼさないことが示された。

早期指標の確立を目指して、母子分離誘発啼鳴反応の生後 24 時間以内 E2 曝露の影響を検討したが、曝露による影響は検出されなかった。また、成熟動物の一部の行動において抑制影響に性差が見られるジアゼパムを投与することにより、母子分離誘発啼鳴反応の性差を検出できるのではないかと考え検討したが、明らかな影響は検出されなかった。従って、早期指標としては他の項目を検討する必要がある。

E. 結論

2 mg/kg といった高い濃度の EE 臨界期曝露は雌ラットの性選好性および性行動を低下させた。また性選好性においては 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EE 曝露においてもある程度の減弱を示したため、性選好性の EDs 曝露に対する感受性は性行動より高い可能性が示された。エ

ストロゲン受容体 α 発現量は部位特異的な変化が示された。不安・学習行動においては、軽微ではあるものの生後 24 時間以内の 2~20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EE 曝露で影響が表れる可能性や、その作用機序が成熟後のエストロゲン感受性の変化である可能性が示された。一方、活動量、うつ様行動、摂食行動、体重へは本研究の曝露条件では影響を及ぼさないことが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Y. Horii, M. Kawaguchi (corresponding), R. Ohta, A. Hirano, G. Watanabe, N. Kato, T. Himi, and K. Taya.

Male hatano high-avoidance rats show high avoidance and high anxiety-like behaviors as compared with male low-avoidance rats.

Exp. Anim., 2012 Sep;61(5): 517-524

2. 学会発表

1) 千本隆志、小林由紀、近藤保彦、川口真以子

出生直後の ethynyl estradiol 曝露がラットの学習行動に及ぼす影響

第17回日本行動内分泌研究会 (2012年8月31日、京都)

2) 小峰千亜希、近藤保彦、植村英恵、千本隆志、川口真以子

出生直後の雌ラット ethynyl estradiol 曝露が成熟後の性行動に及ぼす影響

第105回日本繁殖生物学会大会 (2012年9月6-7日、茨城)

3) 小田島夢花、宮田能、中島春香、近藤保彦、吉田緑、川口真以子

生後 24 時間以内の雌ラットへの ethynyl estradiol 曝露が成熟後の性選好性に与える影響

第15回環境ホルモン学会研究発表会 (2012年12月18-19日、東京)

4) 朝川比登美、千本隆志、神島愛美、小林由紀、吉田緑、川口真以子

生後 24 時間以内の雌ラットへの ethynyl estradiol 曝露が成熟後の探索行動に与える

影響

第15回環境ホルモン学会研究発表会（2012年12月18-19日、東京）

5) 志賀健臣、溝口康、川口真以子

生後24時間以内の雌ラットへのEthynyl estradiol曝露が成熟後のエストロゲン受容体 α 発現に及ぼす影響

第15回環境ホルモン学会研究発表会（2012年12月18-19日、東京）

6) Kamishima M, Kobayashi Y, Senbon T, Komine C, Uemura H, Yoshida M, Kondo Y, Kawaguchi M

EFFECTS OF NEONATAL SINGLE INJECTION OF ETHINYL ESTRADIOL ON FEEDING, LEARNING AND SEXUAL BEHAVIORS IN ADULT FEMALE RATS.

The 17th FAVA Congress（2013年1月5-6日、Taipei、Taiwan）

G. 知的財産権の出願・登録状況
（予定を含む。）

11. 特許取得
該当なし
12. 実用新案登録
該当なし
13. その他
該当なし

(1) Sexually dimorphic expression of hypothalamic estrogen receptors α and β and kiss1 in neonatal male and female rats. Cao J,

Patisaul HB, *J. Comp. Neurol.*, 2011, Epub ahead of print.

(2) Cellular mechanisms of estradiol-mediated sexual differentiation of the brain., Wright CL, Schwarz JS, Dean SL, et. al., *Trends Endocrinol Metab*, 2010, 21, 553-61.

(3) Bisphenol A: developmental toxicity from early prenatal exposure. Golub MS, Wu KL, Kaufman FL, et. al., *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2010, 89, 441-66.

(4) Sexual differentiation of the rodent hypothalamus: hormonal and environmental influences., Negri-Cesi P, Colciago A, Pravettoni A, et.al., *J Steroid Biochem Mol Biol.*, 2008, 109, 294-9.

(5) Effects of developmental exposure to bisphenol A on brain and behavior in mice., Palanza P, Gioiosa L, vom Saal FS, et. al., *Environ Res*. 2008, 108, 150-7.

(6) Female sexual maturation and reproduction after prepubertal exposure to estrogens and endocrine disrupting chemicals: a review of rodent and human data., Rasier G, Toppari J, Parent AS, et. al., *Mol Cell Endocrinol*. 2006, 254-255, 187-201.

(7) Estrogen Receptor Gene Promoter O/B Usage in the Rat Sexually Dimorphic Nucleus of the Preoptic Area., Hamada T and Sakuma Y, *Endocrinology*, 2010, 151(4), 1923-1928.

図1 Estrogen(E2)が引き起こす作用

形成作用

不可逆的
出生前後の一時期

中枢神経系の
形態・回路が
固定化される



活性作用

可逆的
主に成熟後

中枢神経系の
活動が
賦活される



図2 E2が作用する中枢神経系の機能



図3 性選好性試験

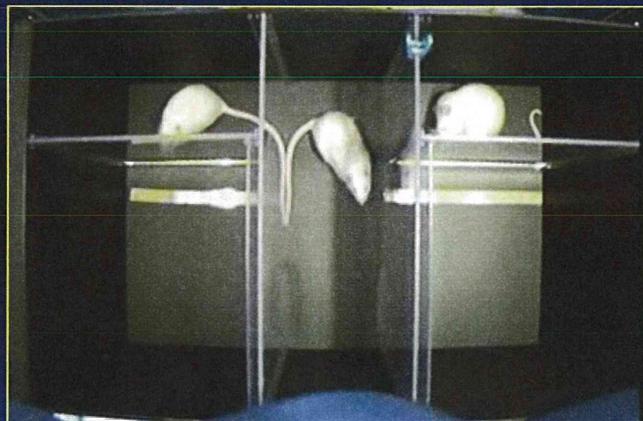


表1 10～14週齢W1雌ラットの性選好性試験結果

接近回数	実験①	実験②
1回目 雄への接近回数	2 mg/kg EE↓	—
性選好性の有無	2 mg/kg EE×、E2×	E2×
2回目 雄への接近回数	—	E2↓
性選好性の有無	2 mg/kg EE×、E2×	2 mg/kg EE×、E2×

接近時間	実験①	実験②
1回目 雄への接近時間	E2↓	E2↓
性選好性の有無	E2×	E2×
2回目 雄への接近時間	—	E2↓
性選好性の有無	0.02 mg/kg EE×、 2 mg/kg EE×、E2×	0.02 mg/kg EE×、 2 mg/kg EE×、E2×

図4 13～14週齢W1雌ラットの性行動試験結果

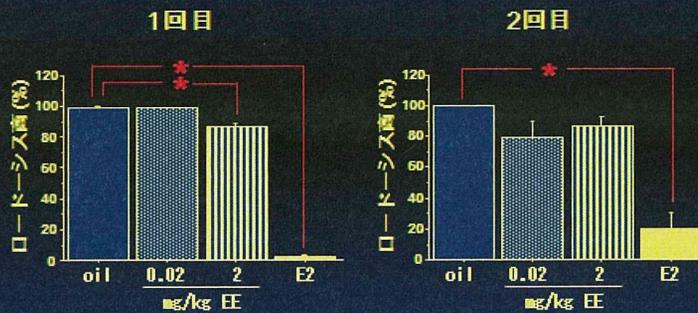


図5 円形オープンフィールド

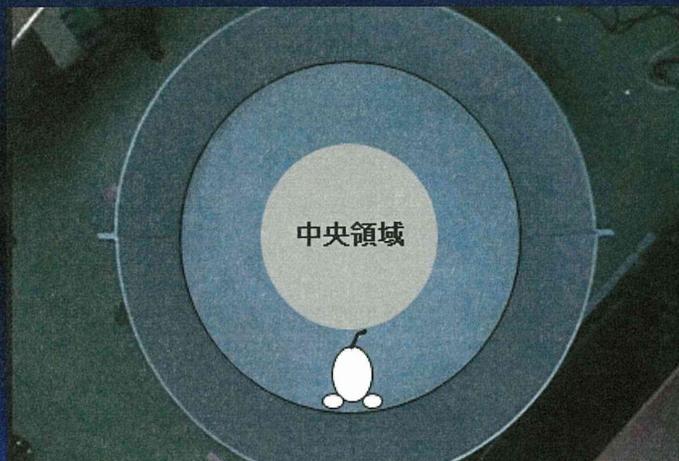


図6 5週齢W1雌ラットの
オープンフィールド試験結果

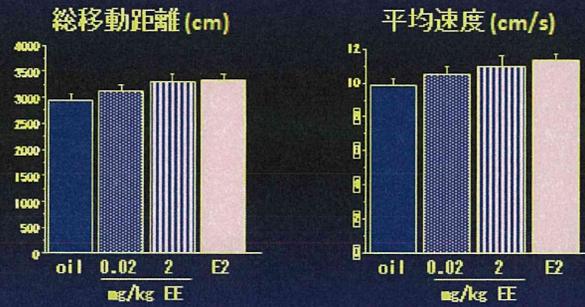


図7 高架十字

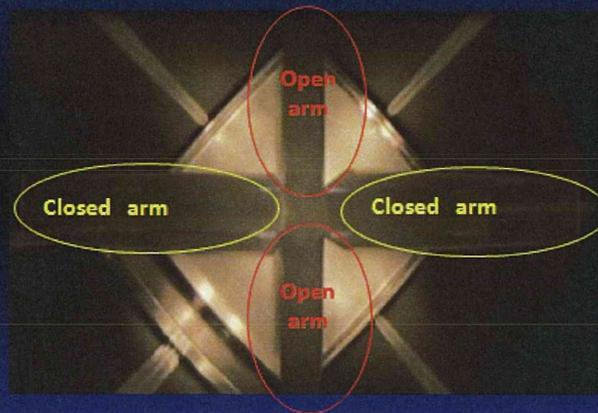
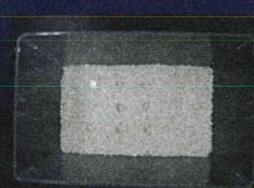


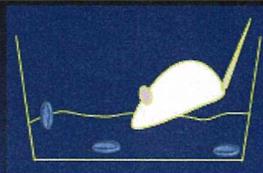
図8 ガラス玉覆い隠し試験



ホームケージに床敷きを2cm厚に敷き、ガラス玉を9個配置



10分間暗室にいれ、床敷きで隠したガラス玉の数を測定する



ガラス玉を隠す行動は不安を反映していると考えられている

メスの性周期によって差が生じることが報告されている